

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 333–339

Der Stoffwechsel von Δ^4 -3-Oxosteroiden in der Rattenleber

Von V. Graef und S. W. Golf

Zentrum für Biochemie der Universität Gießen

(Eingegangen am 19. Dezember 1974)

Herrn Prof. Dr. Hj. Staudinger zum 60. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Es werden die enzymatischen Reaktionen beschrieben, durch die Δ^4 -3-Oxosteroide, insbesondere das Testosteron, in der Rattenleber inaktiviert werden. Eingehend wird die Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase in Lebermikrosomen untersucht und als Enzymsystem erkannt. Die 5 α -Reduktion des Testosterons mit NADPH und mit NADH wird durch verschiedene Enzyme oder Enzymsysteme katalysiert.

The metabolism of Δ^4 -3-oxosteroids in rat liver

Summary: The enzymatic reactions are described by which Δ^4 -3-oxosteroids, specially testosterone, are inactivated in rat liver. The Δ^4 -3-oxosteroid-5 α -reductase in liver microsomes was studied intensively and it was found that it is an enzyme system. The 5 α -reduction of testosterone with NADPH or with NADH depends upon different enzymes or enzyme systems.

Die meisten der von den endokrinen Organen sezernierten Steroidhormone besitzen eine strukturelle Gemeinsamkeit: Im Ring A haben sie eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 und eine Oxogruppe an C-3. Man bezeichnet diese Gruppierung, die offenbar eng mit der biologischen Wirkung verknüpft ist, auch als Δ^4 -3-Oxogruppe. Steroidhormone mit dieser Gruppierung sind z. B. Testosteron, Cortisol, Progesteron und Aldosteron. All diesen Steroidhormonen ist gemeinsam, daß beim Abbau zuerst die Doppelbindung hydriert und anschließend die 3-Oxogruppe reduziert wird. Für beide Reaktionen sind in der Leber verschiedene Enzyme enthalten. Die nach diesen beiden Reduktionsreaktionen entstandenen Tetrahydrosteroiden haben ihre biologische Wirksamkeit verloren, sie sind zu Ausscheidungsprodukten geworden.

Der Metabolismus im Cytoplasma

In Abbildung 1 wird gezeigt, welche Produkte beim Abbau des Testosterons in der Leber entstehen. Das Cytoplasma enthält eine lösliche Δ^4 -3-Oxosteroid-5 β -Reduktase, die bereits 1957 von Tomkins (1) angereichert werden konnte, und die mit NADPH, in geringem Umfang auch mit NADH, die 4,5-Doppelbindung hydrieren kann. Wie Leybold & Staudinger (2) fanden, enthält die Cytoplasmafraktion der männlichen Rattenleber eine höhere 5 β -Reduktase-Aktivität als die der weiblichen Tiere. Das nach Reduktion der 4,5-Doppel-

bindung entstandene 5 β -Dihydrotestosteron kann zu 5 β -Androstan-3 α , 17 β -diol oder zu 5 β -Androstan-3 β , 17 β -diol reduziert werden. Zur Reduktion der 3-Oxogruppe zu 3 α -Hydroxysteroiden scheint es im Cytoplasma der Rattenleber zwei Enzyme zu geben, von denen eines NADH und das andere NADPH als Coenzym benötigt (3, 4). Das Cytoplasma enthält ferner eine NADH-abhängige 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Der Metabolismus in Mikrosomen

Die Mikrosomen der Rattenleber enthalten wahrscheinlich mehrere Enzyme, die die 4,5-Doppelbindung von Δ^4 -3-Oxosteroiden hydrieren können. Die Substrate müssen außer der Doppelbindung eine 3-Oxogruppe besitzen. Leybold & Staudinger (5) gehörten zu den ersten, die die mikrosomale Reduktion von Δ^4 -3-Oxosteroiden untersucht haben. Sie fanden ausgeprägte Geschlechtsunterschiede bei der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion: Die Lebermikrosomen weiblicher Ratten sind etwa 6 mal aktiver bei der Reduktion des Testosterons zu 5 α -Dihydrotestosteron als die Mikrosomen männlicher Ratten. Die Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase weist aber auch erhebliche Speciesunterschiede auf. So gibt es Tiere wie die Maus (6) oder das Meerschweinchen (7), deren Leber fast gar keine Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase enthält. Als Wasserstoffdonator für die Δ^4 -3-Oxosteroid-Reduktion dient im allgemeinen NADPH, doch kann nach Leybold & Staudinger (8, 9) auch NADH die

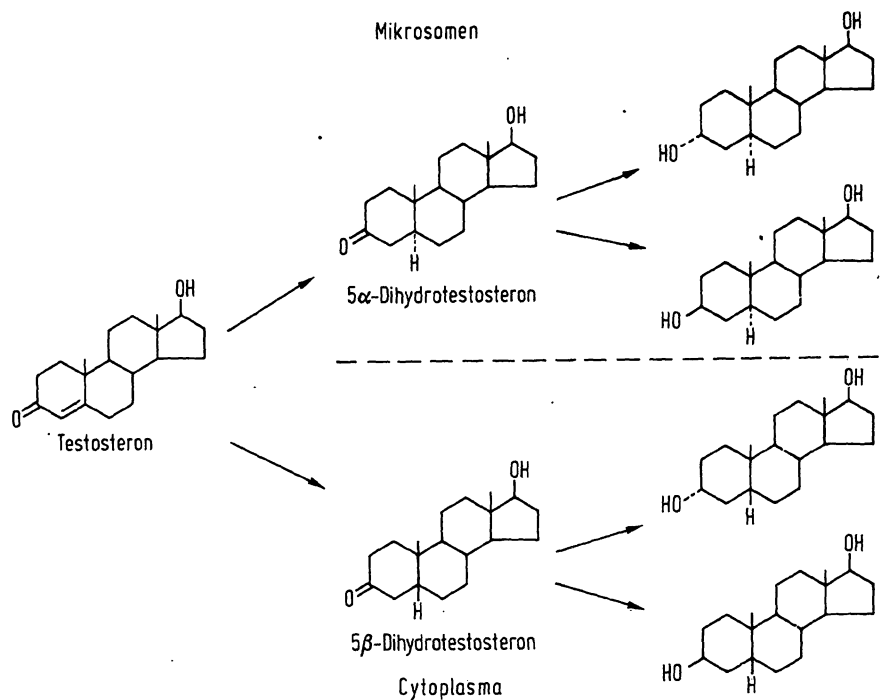


Abb. 1. Stoffwechsel des Testosterons in der Rattenleber.

4,5-Doppelbindung hydrieren, wenn anorganisches Phosphat anwesend ist.

Nachdem die Doppelbindung eines Δ^4 -3-Oxosteroids, z. B. des Testosterons, hydriert ist, kann jetzt auch noch die 3-Oxogruppe des 5 α -Dihydrotestosterons weiter hydriert werden, wobei sowohl 3 α - als auch 3 β -Hydroxysteroidoide gebildet werden. Man vermutet in Rattenlebermikrosomen mehrere Enzyme zur 3 α - und 3 β -Reduktion, wobei sowohl NADH als auch NADPH als Cofaktor dienen können (10). Es wurde auch vermutet, daß die NADH-abhängige 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase identisch mit der Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sei. Auch bei den 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen sind die Geschlechtsunterschiede sehr ausgeprägt. Mit NADPH werden in Mikrosomen der weiblichen Rattenleber hauptsächlich 3 α -Hydroxysteroidoide gebildet, während bei männlichen Ratten fast nur 3 β -Hydroxysteroidoide entstehen sollen (11). Nach unseren eigenen Beobachtungen werden in Mikrosomen der männlichen Rattenleber etwa doppelt so viel 3 α - wie 3 β -Hydroxysteroidoide gebildet.

Der Stoffwechsel des Testosterons in den Mikrosomen der männlichen Rattenleber unterscheidet sich deutlich von dem in der weiblichen Rattenleber. Bei den letzteren werden fast nur 5 α -reduzierte Steroide gebildet, während in Mikrosomen der männlichen Rattenleber neben geringeren Mengen 5 α -reduzierter Steroide eine größere Anzahl hydroxylierter Steroide entsteht (12). *Leybold & Staudinger* (5) konnten erstmals nachweisen, daß bei der Inkubation von Lebermikrosomen männlicher Ratten

mit Testosteron und NADPH 6 β -Hydroxytestosteron gebildet wird. Später wurde auch dessen Hydrierungsprodukt, das 5 α -Androstan-3 α , 6 β , 17 β -triol aus dem Inkubationsmedium isoliert (13). Ferner findet eine Hydroxylierung an 2 α , 2 β , 7 α und 16 α statt (11, 14, 15). An den Hydroxylierungsreaktionen sind NADPH, molekularer Sauerstoff, NADPH : Cytochrom c-Reduktase und Cytochrom P-450 beteiligt (16).

Mechanismus der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion

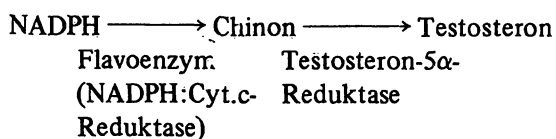
Über den Mechanismus der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion des Testosterons in Rattenleber-Mikrosomen war bisher nur sehr wenig bekannt. Zur Aufklärung des Elektronentransportes von NADPH auf Testosteron haben wir zunächst die Wirkung der in Tabelle 1 aufgeführten Hemmstoffe auf die Reduktion der 4,5-Doppelbindung untersucht (17) und fanden, daß Atebrin und Tenoyl-trifluoracetone die Reduktion des Testosterons hemmten. Daraus schlossen wir auf die Beteiligung eines Flavinenzyms an der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion. Da auch Gallussäurepropylester, ein spezifischer Hemmstoff der NADPH : Cytochrom c-Reduktase (18), die Testosteron-Reduktion hemmte, vermuteten wir, daß dieses Enzym am Elektronentransport von NADPH auf Testosteron beteiligt sein könnte. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sich die Testosteron-5 α -Reduktion durch Cytochrom c hemmen läßt. Wenn die NADPH : Cytochrom c-Reduktase an der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion des Testosterons beteiligt ist,

Tab. 1. Hemmung der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase in Rattenleber-Mikrosomen.

Hemmstoff	Funktion	Hemmstoff-Konzentration (mmol/l)	rel. Aktivität der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase (%)
Atebrin	Hemmstoff für Flavoproteine	0,1	100
		0,5	74
		0,75	0
Tenoyl-trifluoraceton	Hemmstoff für Elektronen-transport FAD \rightarrow CoQ	0,1	45
		0,5	15
		1,0	0
Gallussäurepropylester	Hemmstoff für NADPH: Cytochrom c-Reduktase	1,0	100
		5,0	20
		10,0	0
Pentachlorophenol	Hemmstoff für Chinon-Reduktasen	0,1	100
		0,6	10
		1,23	0
2,4-Dinitrophenol	Entkoppler der Atmungskette Hemmstoff für Chinon-Reduktase	0,1	100
		0,2	62
		0,3	25
CO	Cytochrom P 450	Sättigung	100

müssen sich beide Reaktionen, also Cytochrom c-Reduktion wie auch Testosteron-Reduktion, durch die gleichen Inhibitoren hemmen lassen. Tatsächlich wurde die NADPH : Cytochrom c-Reduktase durch Atebrin, Tenoyl-trifluoraceton, Gallussäurepropylester und 2,4-Dinitrophenol gehemmt. Pentachlorophenol hemmte die NADPH : Cytochrom c-Reduktase jedoch nicht. Daraus schlossen wir, daß an der Testosteron-5 α -Reduktion ein weiteres Enzym beteiligt sein müsse, das durch Pentachlorophenol gehemmt wird. Da sich die Testosteron-5 α -Reduktion durch Tenoyl-trifluoraceton und Pentachlorophenol hemmen ließ, war auch daran zu denken, daß ein Chinon an der Reduktion beteiligt sein könnte.

Auf Grund dieser Hemmstoffversuche haben wir für den Elektronentransfer von NADPH auf Testosteron folgendes Reaktionsschema entworfen:



Danach sollten die Elektronen von NADPH auf das Flavin der NADPH: Cytochrom c-Reduktase, von diesem auf ein Chinon und schließlich mit Beteiligung eines zweiten Enzyms auf Testosteron übertragen werden.

Um festzustellen, welches Chinon an der Testosteron-5 α -Reduktion beteiligt ist, versuchten wir in Gegenwart von Rattenleber-Mikrosomen nur die 2. Reaktion ablaufen zu lassen, indem wir verschiedene Chinone in ihrer reduzierten Form als Wasserstoffdonatoren zur Testosteron-Reduktion einsetzten. Mit reduziertem Vitamin K₃ oder reduziertem Naphthochinon wurde Testosteron nicht hydriert, aber reduziertes Coenzym

Q₁₀ vermochte Testosteron in Gegenwart von Rattenleber-Mikrosomen zu 5 α -Dihydrotestosteron zu reduzieren. Diese Reduktion erfolgt enzymatisch, denn mit hitzeinaktivierten Mikrosomen wurde Testosteron nicht reduziert. Die Reduktion des Testosterons mit reduziertem Coenzym Q₁₀ ließ sich durch Pentachlorophenol vollständig hemmen. Das bestätigt unsere Annahme, daß das 2. Enzym, das wir Testosteron-5 α -Reduktase genannt haben, durch diesen Inhibitor gehemmt wird. Diese Versuche zeigen, daß Coenzym Q₁₀ an der Reduktion der 4,5-Doppelbindung des Testosterons beteiligt ist. Die Anwesenheit von Coenzym Q₁₀ in Lebermikrosomen wurde bereits früher festgestellt (19, 20), doch kannte man bisher keine Funktion dafür in Mikrosomen.

Beteiligung der NADPH: Cytochrom c-Reduktase an der Testosteron-5 α -Reduktion

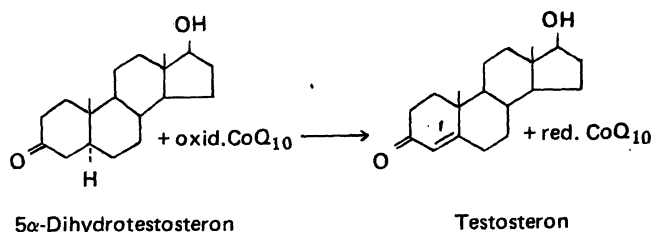
Nach dem vorgeschlagenen Reaktionsschema müssen Rattenleber-Mikrosomen ein Flavoenzym enthalten, das den Wasserstoff von NADPH auf Coenzym Q₁₀ übertragen kann. Wir fanden, daß man mit Lebermikrosomen in Gegenwart von NADPH Coenzym Q₁₀ reduzieren kann. Dabei wird NADPH verbraucht und uns gelang UV-spektroskopisch der Nachweis, daß dabei Coenzym Q₁₀ reduziert wird (21). Da wir annahmen, daß die NADPH: Cytochrom c-Reduktase diese Reaktion katalysiert, haben wir dieses Enzym aus Rattenleber-Mikrosomen mit Hilfe von Lubrol WX, einem nicht-ionischen Detergenz, in Gegenwart von Glycerin und Natriumcitrat solubilisiert, durch DEAE-Cellulose-Chromatographie vorgereinigt und schließlich durch isoelektrische Fokussierung in zwei Enzyme aufgetrennt (21). Diese besaßen beide Cytochrom c-Reduktase-

Aktivität, aber nur eines von ihnen (I) kann außerdem Coenzym Q_{10} reduzieren. Diese NADPH:Cytochrom c-Reduktase I haben wir auf Grund dieser Eigenschaft NADPH:Coenzym Q_{10} -Oxidoreduktase genannt. Nach unseren Untersuchungen ist dieses Enzym I und nicht das andere nach isoelektrischer Fokussierung gewonnene Enzym II an der Reduktion des Testosterons beteiligt. Das konnten wir durch folgende Versuche beweisen.

Wir haben die NADPH:Cytochrom c-Reduktase und damit auch die Testosteron-5 α -Reduktion in Mikrosomen durch Tenoyl-trifluoraceton teilweise gehemmt. Wir versuchten dann, die Hemmung durch Zugabe verschiedener Präparationen der NADPH:Cytochrom c-Reduktase wieder aufzuheben (Tab. 2). Das gelang uns mit einer Präparation der NADPH:Cytochrom c-Reduktase, die wir nach DEAE-Cellulose-Chromatographie erhalten hatten und die NADPH:Cytochrom c-Reduktase I und II enthielt. Durch Zusatz der nach isoelektrischer Fokussierung erhaltenen NADPH:Cytochrom c-Reduktase I wurde die Hemmung ebenfalls teilweise aufgehoben, während NADPH:Cytochrom c-Reduktase II keine Wirkung zeigte. Diese Versuche zeigen, daß jenes Enzym, das sowohl Cytochrom c als auch Coenzym Q_{10} reduzieren kann, an der 5 α -Reduktion des Testosterons beteiligt ist. Den gleichen Versuch haben wir auch mit den anderen Hemmstoffen der NADPH:Cytochrom c-Reduktase ausgeführt (2,4-Dinitrophenol, Atebrin und Gallussäurepropylester). Auch hier ließ sich die Hemmung durch Zusatz der gleichen Enzympräparationen teilweise aufheben. Aus den bisher geschilderten Versuchen wird deutlich, daß die NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase in Rattenleber-Mikrosomen nicht, wie bisher angenommen, ein Enzym sondern ein Enzymsystem ist.

Bisher galt die Reduktion der Doppelbindung des Testosterons und anderer Δ^4 -3-Oxosteroide in der Leber als irreversibel. Auch mit einem Überschuß NADP gelang es nicht, 5 α -Dihydrotestosteron in Testosteron zu überführen. Wir fanden, daß die Rückreaktion unter bestimmten Bedingungen möglich ist (17). In einem enzy-

matischen Ansatz, der Lebermikrosomen, 5 α -Dihydrotestosteron und oxidiertes Coenzym Q_{10} enthielt, wurde etwa 1% des eingesetzten 5 α -Dihydrotestosterons zu Testosteron dehydriert:



Das bedeutet, daß die 2. durch die Testosteron-5 α -Reduktase katalysierte Reaktion reversibel ist. Die Dehydrierung des 5 α -Dihydrotestosterons erfolgt enzymatisch, denn in Gegenwart von hitzeinaktivierten Lebermikrosomen wurde kein Testosteron gebildet.

Solubilisierung und Auftrennung der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase

Da die bisher geschilderten Untersuchungen darauf hindeuten, daß die NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase ein Enzymsystem ist, lag es nahe zu versuchen, dieses in die einzelnen Komponenten aufzutrennen. Da es sich aber um membrangebundene Enzyme handelt, mußten diese zunächst solubilisiert werden, was bisher noch nicht gelungen war. Dafür haben wir verschiedene Detergentien versucht. Bei dem Versuch der Solubilisierung mit Triton N 101, Digitonin, Natriumdesoxycholat und Lensodel ging die enzymatische Aktivität völlig verloren, auch in Gegenwart von Glycerin, das oft zur Stabilisierung von Enzymen verwendet wird. Uns gelang dann die Solubilisierung mit den Detergentien Tween 20 und Lubrol WX in Gegenwart von 40% Glycerin, 0,1 mol/l Natriumcitrat und 0,1 mol/l KCl. Tabelle 3 zeigt, daß sich Lubrol besser zur Solubilisierung eignet als Tween 20. Aus den Angaben in der Tabelle ist ferner zu erkennen, daß in Gegenwart der mit Lubrol solubilisierten Mikrosomen mehr 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol gebildet wird als in Original-Mikrosomen. Unter diesen Bedingungen wird also auch die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase solubilisiert und durch das Detergenz aktiviert. Essentiell für die Solubilisierung ist die Anwesenheit von Natriumcitrat. Fehlt dieses im Solubilisierungsmedium, bleibt die enzymatische Aktivität der NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase zwar erhalten, ist aber nach Zentrifugation bei 144 000 g vollständig im Sediment enthalten. Optimal für die Solubilisierung wirkt eine Natriumcitrat-Konzentration von 0,13 mol/l. Der Zusatz von 0,1 mol/l KCl verbessert die Solubilisierung noch etwas. Wir können vorläufig nicht erklären, in welcher Weise Natriumcitrat auf die Solubilisierung wirkt. Unter den genannten Bedingungen werden auch andere mikrosomale Enzyme des Testosteron-Stoffwechsels solubilisiert (Tab. 4).

Tab. 2. Aktivität der NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase nach Hemmung mit Tenoyltrifluoraceton und nach Zugabe verschiedener Präparationen der NADPH:Cytochrom c-Reduktase (nach l.c. [17]).

Zugesetzte Präparation der NADPH:Cytochrom c-Reduktase	spez. Aktivität (nmol/min · mg Prot.)
—	0,95
NADPH:Cyt. c-Reduktase I + II (nach DEAE-Cellulose-Chromatographie)	1,97
NADPH:Cyt. c-Reduktase I (nach isoelektr. Fokussierung)	1,52
NADPH:Cyt. c-Reduktase II (nach isoelektr. Fokussierung)	0,95
Ungehemmte Reaktion	2,05

Tab. 3. 5α -Reduktion des Testosterons durch Original-Mikrosomen und durch solubilisierete Mikrosomen.

	Testosteron eingesetzt ($\mu\text{mol/l}$)	entstandene Produkte		Summe der 5α -red. Steroide ($\mu\text{mol/l}$)
		3α , 17β -Androstandiol ($\mu\text{mol/l}$)	5α -Dihydrotestosteron ($\mu\text{mol/l}$)	
Original-Mikrosomen	84	8,4	50,8	59,2
Mit Tween 20 solubili- sierte Mikrosomen	84	9,8	9,4	19,2
Mit Lubrol WX solubili- sierte Mikrosomen	84	28,5	42,6	71,1

Tab. 4. Spez. Aktivitäten von Enzymen des Testosteron-Stoffwechsels in Mikrosomen der weiblichen Rattenleber und nach Solubilisierung der Mikrosomen.

Enzym	spez. Aktivität (nmol/min \cdot mg)	
	Original- Mikro- somen	solubili- sierte Mikro- somen
NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase	8,5	22,4
NADH: Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase	19,8	0
NADP: 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	3,7	9,1
NAD: 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	3,3	44,8
NAD: 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	35,6	30,4

Die NAD-abhängige 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird durch das Detergenz bedeutend stärker aktiviert als die NADP: 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Dieses unterschiedliche Verhalten läßt vermuten, daß es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt. Auch die NAD: 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde durch Lubrol solubilisiert.

Die solubilisierete Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase verliert ihre Aktivität im Laufe einiger Tage bei 4°C . Nach drei Tagen war die Aktivität auf 65% abgesunken, doch wirkt ein Zusatz von NADP stabilisierend. Wir haben die solubilisierete Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase durch DEAE-Cellulose-Chromatographie vorgereinigt und eine Anreicherung um den Faktor 4 erreicht. Die vereinigten Fraktionen mit Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase-Aktivität konnten wir durch Zusatz von 20% Ammoniumsulfat von Begleitproteinen befreien; durch 30% Ammoniumsulfat ließ sich die NADPH: Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktase präzipitieren. Es wurde, bezogen auf die Aktivität in Original-Mikrosomen, eine Anreicherung um den Faktor 16,8 erreicht.

Wir haben ferner versucht, die beiden an der Testosteron-Reduktion beteiligten Enzyme nach Solubilisierung der Mikrosomen von einander zu trennen. Das erreichten wir durch Affinitätschromatographie. An Sepharose wurde zunächst als Spacer *n*-Octyldiamin mit der Bromcyan-Methode gebunden. Das entstandene Amin wurde an-

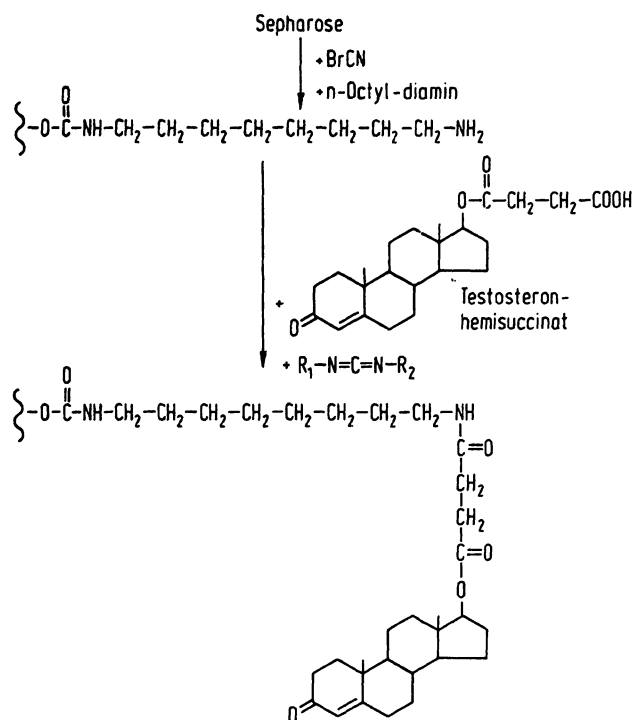


Abb. 2. Darstellung von Testosteron-hemisuccinat-Sepharosc.

schließend mit Hilfe von Carbodiimid mit Testosteron-hemisuccinat verknüpft (Abb. 2). Das solubilisierete Enzymsystem zur Δ^4 -3-Oxosteroid- 5α -Reduktion wurde an einer Säule aus Testosteron-hemisuccinat-Sepharose getrennt. Es war zu erwarten, daß nur die Testosteron- 5α -Reduktase adsorbiert werden würde, während die NADPH: Cytochrom c-Reduktase und Coenzym Q_{10} die Säule passieren und im Vorlauf erscheinen würden. Nach Abtrennung von NADPH: Cytochrom c-Reduktase und Coenzym Q_{10} haben wir die Testosteron- 5α -Reduktase mit dem gleichen Puffer, der außerdem 1 mol/l KCl und 0,1 mmol/l Testosteron enthielt, von der Säule eluiert. Testosteron wurde zugegeben, um die Testosteron- 5α -Reduktase zu stabilisieren. Wir untersuchten nun zwei Fraktionen des Vorlaufs sowie eine Fraktion des Eluates (mit dem höchsten Proteingehalt) auf ihre Fähigkeit, Testosteron in Gegenwart von NADPH reduzieren zu können. Tabelle 5 zeigt, daß mit beiden Fraktionen des Vorlaufs eine Reduktion des Testosterons

Tab. 5. Inkubation von Testosteron mit Fraktionen, die nach Affinitätschromatographie der solubilisierten Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase erhalten wurden.

Inkubation von	Testosteron eingesetzt (nmol)	5 α -Dihydrotesto- steron + 5 α -Andro- standiol gebildet (nmol)	(%)
Vorlauf I, II + NADPH	300	0	0
Eluat + NADPH	300	12,9	4,3
Vorlauf I + Eluat + NADPH	300	144	48,0
Vorlauf II + Eluat + NADPH	300	26,6	8,9
Vorlauf II + Eluat + NADPH + Coenzym Q ₁₀	300	81	27,0

nicht möglich war. Mit der Eluatfraktion wurden nur 4,3% des eingesetzten Testosterons reduziert. Wurde aber die Vorlauffraktion I mit der Eluatfraktion vereinigt, wurden in Gegenwart von NADPH 48% des eingesetzten Testosterons in 5 α -Dihydrotestosteron und 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol überführt. Nach Inkubation der Vorlauffraktion II mit der Eluatfraktion, Testosteron und NADPH wurden nur 8,9% des Testosterons reduziert. Wir vermuteten, daß die Vorlauffraktion II nicht genügend Coenzym Q₁₀ enthielt, und versetzten diesen Kombinationsansatz mit Coenzym Q₁₀. Dadurch ließ sich die Testosteron-5 α -Reduktion verdreifachen. Wir konnten Testosteron auch zu 5 α -Dihydrotestosteron reduzieren, wenn wir es mit der Eluatfraktion und reduziertem Coenzym Q₁₀ inkubierten. Diese Versuche beweisen wiederum die Beteiligung von Coenzym Q₁₀ an der Testosteron-5 α -Reduktion. Nach Inkubation der hitzeinaktivierten Vorlauffraktion mit Eluat, Testosteron und NADPH sowie der erhitzten Eluatfraktion mit der Vorlauffraktion, Testosteron und NADPH fand keine 5 α -Reduktion des Testosterons statt. Auch diese Versuche zeigen, daß an der Testosteron-5 α -Reduktion zwei Enzyme beteiligt sind: NADPH:Cytochrom c-Reduktase und eine Testosteron-5 α -Reduktase. NADPH:Cytochrom c-Reduktase ist auch an weiteren Reaktionen des Steroidstoffwechsels beteiligt, und zwar zusammen mit Cytochrom P-450 an Hydroxylierungsreaktionen, an der 17, 20-Lyase-Reaktion (22) und an der Aromatisierung in Placenta-Mikrosomen (23). Der Befund von *Pollow* (24), daß der Wasserstoff von der 4B-Seite des NADPH auf die 4,5-Doppelbindung des 4-Androsten-3,17-dions übertragen wird, steht nicht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, denn wie *Sih et al* (25) fanden, wird der Wasserstoff des NADPH ebenfalls von der 4B-Seite auf NADPH:Cytochrom c-Reduktase übertragen. *Pollow* wie auch wahrscheinlich *Björkhem* (26) untersuchten also nur die Stereospezifität des ersten Schrittes der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion.

Der geschilderte Mechanismus der Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion gilt vorläufig nur für Testosteron. Man kann noch nicht sagen, ob andere Δ^4 -3-Oxosteroiden in der Leber nach dem gleichen oder einem anderen Mechanis-

mus reduziert werden. Es wäre auch möglich, daß die Reduktion verschiedener Δ^4 -3-Oxosteroiden mit derselben NADPH:Cytochrom c-Reduktase und verschiedenen Steroid-5 α -Reduktasen erfolgt. Bereits *McGuire & Tomkins* (27) vermuteten, daß es in der Rattenleber fünf verschiedene Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktasen mit hoher Substratspezifität gibt. Auch aus den Untersuchungen von *Leybold & Staudinger* (28) geht hervor, daß es mindestens zwei solcher 5 α -Reduktasen in der Rattenleber geben muß, nämlich für 11-Desoxy- und für 11-Oxy- Δ^4 -3-oxosteroiden. Die 11-Desoxysteroiden werden doppelt so schnell umgesetzt wie die 11-Oxysteroiden Cortisol, Cortison und Corticosteron. Bei unseren Untersuchungen haben wir uns vorläufig nur auf die Rattenleber beschränkt. Ob die Δ^4 -3-Oxogruppe in anderen Organen nach dem gleichen oder einem anderen Mechanismus reduziert wird, ist bis jetzt auch noch ungeklärt.

Die NADH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase

Zur 5 α -Reduktion des Testosterons kann nach *Leybold & Staudinger* (8, 9) auch NADH als Wasserstoffdonator dienen; die Reduktion mit NADH läuft aber nur in Gegenwart von anorganischem Phosphat oder Arsenat ab. Man hat bisher angenommen, daß es dasselbe Enzym ist, das sowohl NADPH als auch NADH als Coenzym benutzen kann. Nach unseren Untersuchungen scheint es aber sicher zu sein, daß es zwei verschiedene Enzyme oder Enzymsysteme für die Reduktion mit NADPH und NADH in Rattenleber-Mikrosomen gibt. Dafür sprechen folgende Beobachtungen:

1. Die Reduktion des Testosterons mit NADPH wird durch 2,4-Dinitrophenol gehemmt, die Reduktion mit NADH jedoch nicht.

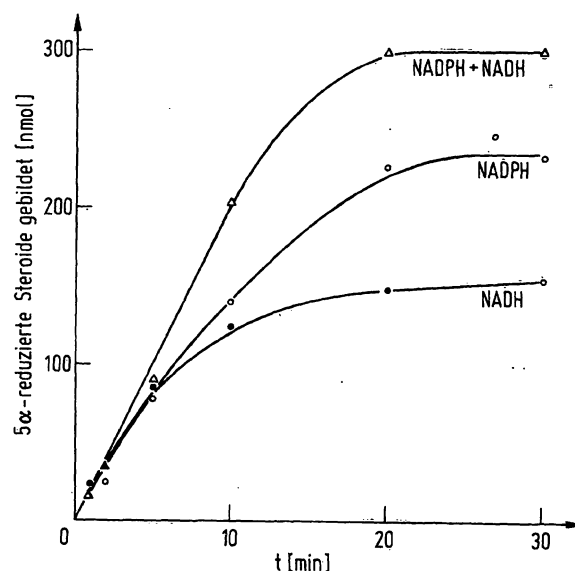


Abb. 3. Reduktion von Testosteron (0,3 μ mol) mit NADPH und NADH (je 1,0 μ mol) in Gegenwart von Mikrosomen der weiblichen Rattenleber.

2. Bei der Solubilisierung der Rattenleber-Mikrosomen wird nur das NADPH-abhängige Enzymsystem in aktiver Form solubilisiert, nicht jedoch das NADH-abhängige Enzym.
3. Die Testosteron-Reduktion mit NADPH läuft auch in Trispuffer ab, während NADH in diesem Puffer zu keiner Testosteron-Reduktion führt.
4. Lebermikrosomen, die man mit Isobutanol/Heptan und anschließend mit Aceton behandelt hat, behalten ihre Aktivität für die NADH-abhängige Reaktion. Dagegen geht die Aktivität für die NADPH-abhängige Reaktion nach Aceton-Extraktion der Mikrosomen verloren.
5. Man kann den Umsatz der Testosteron-Reduktion mit NADPH in Lebermikrosomen erhöhen, wenn man zusätzlich NADH dazugibt (Abb. 3). Beide Pyridin-

nucleotide wirken etwa additiv, was auch für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Enzymen oder Enzymsystemen spricht.

Wir haben weitere Untersuchungen vorgesehen, um auch den Mechanismus der NADH-abhängigen Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion in Lebermikrosomen aufzuklären. Insbesondere soll festgestellt werden, ob es sich auch hierbei um ein Enzymsystem handelt. Dazu wird es nötig sein, auch die NADH: Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktase zu solubilisieren, was uns bisher noch nicht gelungen ist.

Danksagung

Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

1. Tomkins, G. M. (1957), *J. Biol. Chem.* 225, 13–24.
2. Leybold, K. & Staudinger, H. (1960), *Med. Exp. (Basel)* 2, 46–53.
3. Repke, K. & Samuels, L. T. (1964), *Biochemistry* 3, 685–688.
4. Doman, E. & Koide, S. S. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* 128, 209–211.
5. Leybold, K. & Staudinger, H. (1959), *Biochem. Z.* 331, 389–398.
6. Jagarinec, N., Chamberlain, J. & Ofner, P. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 144, 479–481.
7. Brown-Grant, K., Forchielli, E. & Dorfman, R. I. (1960), *J. Biol. Chem.* 235, 1317–1320.
8. Leybold, K. & Staudinger, H. (1962), *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 626–628.
9. Leybold, K. & Staudinger, H. (1963), *Biochem. Z.* 337, 320–327.
10. Björkhem, I., Danielsson, H. & Wikvall, K. (1973), *Eur. J. Biochem.* 36, 8–15.
11. Einarsson, K., Gustafsson, J.-A. & Goldman, A. S. (1972), *Eur. J. Biochem.* 31, 345–353.
12. Schriefers, H., Cremer, W. & Otto, M. (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 183–193.
13. Abraham, R. & Staudinger, H. (1966), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 346, 198–207.
14. Danielsson, H. & Johansson, G. (1972), *FEBS-Lett.* 25, 329–333.
15. Conney, A. H. & Klutch, A. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 1611–1617.
16. Omura, T., Sato, R., Cooper, D. Y., Rosenthal, O. & Estabrook, R. W. (1965), *Fed. Proc.* 24, 1181–1189.
17. Golf, S. W., Graef, V. & Staudinger, H. (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 1499–1507.
18. Torielli, N. F. & Slater, T. F. (1971), *Biochem. Pharmacol.* 20, 2027–2033.
19. Leonhäuser, S., Leybold, K., Krisch, K., Staudinger, H., Gale, P. H., Page, A. C. Jr. & Folkers, K. (1962), *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 580–582.
20. Krishnaiah, K. V. & Ramasarma, T. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 202, 332–342.
21. Golf, S. W., Graef, V. & Staudinger, H. (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 1063–1069.
22. Betz, G., Roper, M. & Tsai, P. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 318–323.
23. Thompson, E. A. & Siiteri, P. K. (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 5373–5378.
24. Pollow, K. & Pollow, B. (1970), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 547–562.
25. Sih, C. J., Tsong, Y. Y. & Stein, B. (1968), *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 5300.
26. Björkhem, I. (1969), *Eur. J. Biochem.* 8, 345–351.
27. McGuire, J. S. & Tomkins, G. M. (1960), *J. Biol. Chem.* 235, 1634–1638.
28. Leybold, K. & Staudinger, H. (1959), *Biochem. Z.* 331, 399–409.

Dr. V. Graef
Zentrum f. Biochem. am
Klinikum d. Justus Liebig-Univ.
6300 Gießen
Friedrichstr. 24

